



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, A61K 48/00, C12N 9/02, A61K 38/43	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/00790 (43) Date de publication internationale: 11 janvier 1996 (11.01.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00854 (22) Date de dépôt international: 27 juin 1995 (27.06.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/08029 29 juin 1994 (29.06.94) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BARKATS, Martine [FR/FR]; 7, rue Nicolas-Houel, F-75005 Paris (FR). MALLET, Jacques [FR/FR]; 18, rue Charcot, F-75013 Paris (FR). PERRICAUDET, Michel [FR/FR]; 31, rue de Chartres, F-28320 Ecrosnes (FR). REVAH, Frédéric [FR/FR]; Bâtiment Flandre 2, 49, rue de Châtenay, F-92160 Antony (FR). (74) Mandataire: LE COUPANEC, Pascale; Rhône-Poulenc Rorer S.A., 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).	(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(54) Title: ADENOVIRUS INCLUDING A GENE CODING FOR A SUPEROXIDE DISMUTASE (54) Titre: ADENOVIRUS COMPRENANT UN GENE CODANT POUR UNE SUPEROXYDE DISMUTASE (57) Abstract A defective recombinant adenovirus including at least one DNA sequence coding for all or an active part of a superoxide dismutase or a derivative thereof. The therapeutical use thereof and corresponding pharmaceutical compositions are also disclosed. (57) Abrégé La présente invention se rapporte à un adénovirus recombinant défectif comprenant au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou une partie active d'une superoxyde dismutase ou un de ses dérivés. Elle vise également leur utilisation en thérapie et des compositions pharmaceutiques correspondantes.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brsil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Sllovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

ADENOVIRUS COMPRENANT UN GENE CODANT POUR UNE SUPEROXYDE DISMUTASE

La présente invention concerne des adénovirus recombinants comprenant une séquence d'ADN codant pour une superoxyde dismutase et ses utilisations en thérapie
5 génique.

L'oxygène occupe une place essentielle dans de nombreux processus physiologiques ou pathologiques. La réduction de l'oxygène moléculaire provoque la formation d'espèces chimiques hautement réactives comme le radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle. Ce dernier, formé à partir du superoxyde
10 et du peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Haber-Weiss, est le radical libre le plus réactif. De part la présence d'un électron libre dans leur couche externe, ces radicaux sont hautement réactifs. Cette réactivité peut être préjudiciable à l'égard de molécules biologiques importantes telles que l'ADN, des protéines cellulaires essentielles et les lipides membranaires. En outre, ces radicaux libres peuvent initier
15 des réactions en chaîne telle qu'une peroxydation lipidique qui peut altérer l'intégrité des cellules et causer leur destruction.

Une série de mécanismes de défense antioxydants existe naturellement pour réguler cette production de radicaux libres et prévenir des dommages de tissus et/ou
cellules.

20 C'est ainsi que la formation de ces entités hautement réactives est normalement régulée ou inhibée par une dismutation de l'ion superoxyde, par l'enzyme superoxyde dismutase, en peroxyde d'hydrogène, ce dernier étant ensuite converti en eau et oxygène par soit la glutathion peroxidase soit la catalase.

Malheureusement, sous certaines conditions, ces mécanismes de régulation ne
25 sont pas totalement efficaces. Il s'en suit un excès en radicaux libres qui entraîne des pathologies de type inflammations, emphysèmes, néoplasmes ou rétinopathies. Il est ainsi aujourd'hui reconnu que ces radicaux libres interviennent au niveau de l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires, la cirrhose du foie, le diabète, la formation de cataracte, dans un certain nombre de maladies neurologiques incluant la
30 maladie de Parkinson et l'ischémie cérébrale, au niveau de la trisomie 21, ainsi que dans le processus de vieillissement. Enfin, l'anion superoxyde semble également être impliqué dans la pathogénèse de l'hypertension pulmonaire induite par TNF (Tumor Necrosis Factor).

La présente invention a précisément pour objet de proposer un moyen pour
35 suppléer à ce type de déficience des mécanismes de régulation naturels et ceci en intervenant plus particulièrement au niveau de l'activité de la superoxyde dismutase.

Comme explicité précédemment, la fonction principale de cette enzyme, chez les mammifères, est de détruire les radicaux superoxydes qui sont générés lors des diverses réactions biologiques d'oxydoréduction. Cette enzyme est par conséquent particulièrement importante puisqu'elle procure une défense contre les toxicités à l'oxygène et tout dommage pouvant être causé aux cellules par des hydrocarbures carcinogènes.

La superoxyde dismutase est en fait une variété de différentes enzymes présentes chez la plupart des êtres vivants. Il existe trois formes de SOD, avec des distributions distinctes et caractérisées chacune par la nature de leur composant métal: la CuZnSOD intracellulaire spécifique des eucaryotes, la MnSOD dépendante du manganèse et produite au niveau des mitochondries chez les eucaryotes et procaryotes (Creagan R. et al. Humangenetic 20 203-209 1973) et la FeSOD, dépendante du fer, cytosolique et présente essentiellement chez les procaryotes (Hendrickson D et al. Genomics 8, 736-738 1990). Il existe également une SOD à cuivre et zinc extracellulaire.

La CuZn superoxyde dismutase intracellulaire, dite SOD1, constitue approximativement 85 à 90% de la totalité de l'activité SOD cellulaire. Il s'agit d'une protéine dimère, composée apparemment de deux sous-unités identiques, liées de manière non covalente, chacune d'entre-elles ayant un poids moléculaire de l'ordre de 16.000 à 19.000 (Lieman-Hurwitz J. et al; Biochem Int. 3:107-115, 1981). Le locus pour la superoxyde dismutase cytoplasmique humaine se trouve sur le chromosome 21. (Tan Y.H. et al. J. Exp. Med. 137: 317-330, 1973).

Normalement, la CuZn superoxyde dismutase endogène est présente dans les tissus dans des quantités limitées et lorsque des quantités importantes en anions superoxyde sont produites, sa concentration s'avère nettement insuffisante.

Par ailleurs, il a récemment été démontré que des mutations ponctuelles au niveau du gène CuZnSOD humain étaient associées au développement d'une pathologie, la sclérose latérale amyotrophique (ALS). Cette maladie grave se traduit par une dégénérescence létale des neurones moteurs dans le cerveau et la moelle épinière. Ces mutations affectent l'activité de l'enzyme correspondante CuZnSOD (Deng H. X. et al, Science, 261, 1047 1993).

Il y a donc aujourd'hui un besoin en CuZnSOD exogène pour des administrations cliniques afin de suppléer à de telles carences ou anomalies.

Inversement, sous certaines conditions, une concentration trop élevée en SOD peut être toxique à l'égard des cellules la produisant. La SOD est une enzyme de

protection assurant normalement un niveau minimal en radicaux superoxyde au sein de la cellule. Pour ce faire, elle catalyse l'interaction de radicaux libres en vue d'en oxyder un et de réduire l'autre, soit une réaction de dismutation, qui conduit à la formation d'eau oxygénée. En soit, le radical superoxyde n'est pas particulièrement toxique. Le danger vient de sa capacité à interagir avec l'eau oxygénée pour générer de l'oxygène singulet et des radicaux hydroxyle, deux formes hautement réactives et extrêmement toxiques de l'oxygène. Une quantité accrue en superoxyde dismutase peut donc conduire à une production accrue en eau oxygénée avec les conséquences explicitées précédemment. Ce phénomène se traduit notamment physiologiquement par une augmentation de la lipoperoxydation avec diminution de la teneur en acide gras insaturés des membranes cellulaires et pour conséquence principale une perturbation des fonctions membranaires.

Dans ce dernier cas, il serait donc avantageux de pouvoir réguler l'activité de la superoxyde dismutase soit par exemple à l'aide d'antisens ou de mutants dominants négatifs.

Le potentiel clinique de l'enzyme superoxyde dismutase est par conséquent considérable et il serait particulièrement important de pouvoir contrôler efficacement son activité soit en la stimulant, la réprimant ou en y suppléant.

Plus précisément, la présente invention réside dans la mise au point de vecteurs particulièrement efficaces pour délivrer in vivo et de manière localisée, des quantités thérapeutiquement actives du gène spécifique codant pour une superoxyde dismutase ou l'un de ses dérivés.

Dans la demande copendante n° PCT/EP93/02519, il a été montré que les adénovirus pouvaient être utilisés comme vecteur pour le transfert d'un gène étranger in vivo dans le système nerveux et l'expression de la protéine correspondante.

La présente invention concerne plus particulièrement des constructions nouvelles, particulièrement adaptées et efficaces pour contrôler l'expression de la superoxyde dismutase.

Plus précisément, elle se rapporte à un adénovirus recombinant comprenant une séquence d'ADN propre à contrôler l'expression de la superoxyde dismutase, sa préparation et son utilisation pour des traitements thérapeutiques et/ou la prévention de diverses pathologies.

La demanderesse a ainsi mis en évidence qu'il est possible de construire des adénovirus recombinants contenant une séquence codant pour une superoxyde

dismutase, d'administrer ces adénovirus recombinants in vivo, et que cette administration permet une expression stable et localisée de quantités thérapeutiquement actives de la superoxyde dismutase in vivo.

Un premier objet de l'invention réside donc dans un adénovirus recombinant
5 défectif comprenant au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou une partie active d'une superoxyde dismutase ou l'un de ses dérivés.

La superoxyde dismutase produite dans le cadre de la présente invention peut être une superoxyde dismutase humaine ou animale. Selon un mode de réalisation privilégié de l'invention, il s'agit de l'une des trois formes de la superoxyde dismutase
10 humaine précédemment décrites, CuZnSOD (SOD₁), MnSOD (SOD₂) et SOD extracellulaire (SOD₃). Plus préférentiellement, la séquence d'ADN intégrée dans l'adénovirus selon l'invention code pour tout ou une partie active de la CuZn superoxyde dismutase humaine intracellulaire, hSOD1, ou l'un de ses dérivés.

15 La séquence d'ADN codant pour la superoxyde dismutase, utilisée dans le cadre de la présente invention peut être un ADNc, un ADN génomique (ADNg), ou une construction hybride consistant par exemple en un ADNc dans lequel seraient insérés un ou plusieurs introns. Il peut également s'agir de séquences synthétiques ou semisynthétiques.

20 De manière particulièrement avantageuse, on utilise un ADNc ou un ADNg.

Selon un mode préféré de l'invention, il s'agit une séquence d'ADN génomique (ADNg) codant pour une superoxyde dismutase. Son utilisation peut permettre une meilleure expression dans les cellules humaines.

25 Bien entendu, préalablement à son incorporation dans un vecteur adénovirus selon l'invention, la séquence d'ADN peut être avantageusement modifiée, par exemple par mutagenèse dirigée, en particulier pour l'insertion de sites de restriction appropriés. Les séquences décrites dans l'art antérieur ne sont en effet pas construites pour une utilisation selon l'invention, et des adaptations préalables peuvent s'avérer nécessaires, pour obtenir des expressions importantes.

30 Au sens de la présente invention, on entend par dérivé de la superoxyde dismutase, toute séquence obtenue par modification et codant pour un produit conservant l'une au moins des propriétés biologiques de la superoxyde dismutase. Par modification, on doit entendre toute mutation, substitution, délétion, addition ou

modification de nature génétique et/ou chimique. Ces modifications peuvent être réalisées par les techniques connues de l'homme du métier (voir techniques générales de biologie moléculaire ci-après). Les dérivés au sens de l'invention peuvent également être obtenus par hybridation à partir de banques d'acides nucléiques, en utilisant
5 comme sonde la séquence native ou un fragment de celle-ci.

Ces dérivés sont notamment des molécules ayant une plus grande affinité pour leurs sites de fixation, des séquences permettant une expression améliorée in vivo, des molécules présentant une plus grande résistance aux protéases, des molécules ayant une efficacité thérapeutique plus grande ou des effets secondaires moindres, ou
10 éventuellement de nouvelles propriétés biologiques.

Parmi les dérivés préférés, on peut citer plus particulièrement les variants naturels, les molécules dans lesquelles un ou plusieurs résidus ont été substitués, les dérivés obtenus par délétion de régions n'intervenant pas ou peu dans l'interaction avec les sites de liaison considérés ou exprimant une activité indésirable, et les dérivés
15 comportant par rapport à la séquence native des résidus supplémentaires, tels que par exemple un signal de sécrétion et/ou un peptide de jonction.

Par dérivé de la superoxyde dismutase on entend également couvrir dans le cadre de la présente invention, les mutants dits dominants négatifs de la superoxyde dismutase. Plus précisément, dans ce cas, le gène cloné est altéré de manière à ce qu'il
20 code pour un produit mutant capable d'inhiber l'activité cellulaire de la superoxyde dismutase sauvage. Ce type de dérivé est particulièrement intéressant lorsque l'on cherche par exemple à réprimer une surexpression naturelle de la superoxyde dismutase.

La séquence d'ADN, codant pour tout ou partie de la superoxyde dismutase ou l'un de ses dérivés, peut également être une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de la superoxyde dismutase. Préférentiellement, la séquence d'ADN hétérologue comporte un gène codant pour un ARN antisens capable de contrôler la traduction de l'ARNm correspondant. La
25 séquence antisens peut être tout ou seulement une partie de la séquence d'ADN, codant pour la superoxyde dismutase, insérée dans l'orientation inverse dans le vecteur selon l'invention.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la séquence d'ADN, codant pour la superoxyde dismutase ou l'un de ses dérivés, intègre également un

signal de sécrétion permettant de diriger la superoxyde dismutase synthétisée dans les voies de sécrétion des cellules infectées. De cette manière, la superoxyde dismutase synthétisée est avantageusement libérée dans les compartiments extracellulaires. Toutefois, il peut également s'agir d'un signal de sécrétion hétérologue ou même
5 artificiel. Dans le cas particulier de la forme SOD₃, le signal de sécrétion peut être avantageusement le propre signal de SOD₃.

Avantageusement, la séquence codant pour la superoxyde dismutase est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules cibles. Préférentiellement, il s'agit de signaux d'expression hétérologues, c'est-à-dire de
10 signaux différents de ceux naturellement responsables de l'expression de la superoxyde dismutase. Il peut s'agir en particulier de séquences responsables de l'expression d'autres protéines, ou de séquences synthétiques. Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De
15 même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris l'adénovirus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs E1A, MLP, CMV, LTR-RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique. Il peut en effet être particulièrement intéressant d'utiliser des signaux
20 d'expression actifs spécifiquement ou majoritairement dans les cellules cibles, de manière à ce que la séquence d'ADN ne soit exprimée et ne produise son effet que lorsque le virus a effectivement infecté une cellule cible.

Dans un premier mode de réalisation particulier, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc codant pour la
25 CuZn superoxyde dismutase humaine intracellulaire sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNg codant pour la
30 CuZn superoxyde dismutase humaine intracellulaire sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.

Un mode particulièrement préféré de mise en oeuvre de la présente invention réside dans un adénovirus recombinant défectif comprenant les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, une séquence d'ADN codant pour la CuZn superoxyde dismutase humaine intracellulaire ou un dérivé de celle-ci sous le contrôle

d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans les tissus cibles et dans lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 est non fonctionnel.

Les adénovirus défectifs selon l'invention sont des adénovirus incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des adénovirus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par la séquence d'ADN codant pour la superoxyde dismutase.

Préférentiellement, le virus défectif de l'invention conserve les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales. Encore plus préférentiellement, comme indiqué ci-avant, le génome du virus recombinant défectif selon l'invention comprend les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, le gène E1 non fonctionnel et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 non fonctionnel.

Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande FR 93 05954). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la séquence d'ADN codant pour la superoxyde dismutase. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences

capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la
5 partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). Des stratégies de construction de vecteurs dérivés des adénovirus ont également été décrites dans les demandes n° FR 93 05954 et FR 93 08596 qui sont incorporées à la présente demande par référence.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon
10 les techniques classiques de biologie moléculaire.

Les propriétés particulièrement avantageuses des vecteurs de l'invention découlent notamment de la construction utilisée (adénovirus défectif, délété de certaines régions virales), du promoteur utilisé pour l'expression de la séquence codant pour la superoxyde dismutase (promoteur viral ou tissu-spécifique de préférence), et
15 des méthodes d'administration dudit vecteur, permettant l'expression efficace et dans les tissus appropriés de la superoxyde dismutase.

La présente invention concerne également toute utilisation d'un adénovirus tel que décrit ci-dessus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des pathologies précédemment citées. Plus
20 particulièrement, elle concerne toute utilisation de ces adénovirus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies neurodégénératives comme par exemple la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique (ALS), et la trisomie 21. Ils peuvent être également avantageusement utilisés dans le traitement de l'athérosclérose, des
25 maladies cardiovasculaires, de la cirrhose du foie, du diabète, de la formation de cataracte ainsi que du processus de vieillissement.

On peut en outre, parfaitement envisager de procéder à une administration conjointe d'un adénovirus selon l'invention avec au moins un second adénovirus comportant un gène codant pour la catalase (P. Amstad et al. Biochemistry 1991, 30,
30 9305-9313), autre enzyme importante dans la régulation de la production en radicaux libres.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant au moins un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que

décrits précédemment, associé, le cas échéant, à un adénovirus recombinant comportant un gène codant pour la catalase..

Ces compositions pharmaceutiques peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe chez le patient. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

A cet égard, l'invention concerne également une méthode de traitement des maladies neurodégénératives comprenant l'administration à un patient d'un adénovirus recombinant tel que défini ci-avant. Plus particulièrement, l'invention concerne une méthode de traitement des maladies neurodégénératives comprenant l'administration stéréotaxique d'un adénovirus recombinant tel que défini ci-avant.

Les doses d'adénovirus recombinant déficient utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, puis mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

Un autre objet de l'invention concerne toute cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits ci-dessus. Plus particulièrement, l'invention concerne toute population de cellules humaines infectée par ces adénovirus. Il peut s'agir en particulier de fibroblastes, myoblastes, hépatocytes, kératinocytes, cellules endothéliales, cellules Gliales, etc.

Les cellules selon l'invention peuvent être issues de cultures primaires. Celles-ci peuvent être prélevées par toute technique connue de l'homme du métier, puis mises en culture dans des conditions permettant leur prolifération. S'agissant plus particulièrement de fibroblastes, ceux-ci peuvent être aisément obtenus à partir de

biopsies, par exemple selon la technique décrite par Ham [Methods Cell.Biol. 21a (1980) 255]. Ces cellules peuvent être utilisées directement pour l'infection par les adénovirus, ou conservées, par exemple par congélation, pour l'établissement de banques autologues, en vue d'une utilisation ultérieure. Les cellules selon l'invention
5 peuvent également être des cultures secondaires, obtenues par exemple à partir de banques préétablies.

Les cellules en culture sont ensuite infectées par des adénovirus recombinants, pour leur conférer la capacité de produire de la superoxyde dismutase. L'infection est réalisée in vitro selon des techniques connues de l'homme du métier. En
10 particulier, selon le type de cellules utilisé et le nombre de copies de virus par cellule désiré, l'homme du métier peut adapter la multiplicité d'infection. Il est bien entendu que ces étapes doivent être effectuées dans des conditions de stérilité appropriées lorsque les cellules sont destinées à une administration in vivo. Les doses d'adénovirus recombinant utilisées pour l'infection des cellules peuvent être adaptées par l'homme
15 du métier selon le but recherché. Les conditions décrites ci-avant pour l'administration in vivo peuvent être appliquées à l'infection in vitro.

Un autre objet de l'invention concerne un implant comprenant des cellules mammifère infectées par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs telles que décrites ci-dessus, et une matrice extracellulaire. Préférentiellement, les implants selon
20 l'invention comprennent 10^5 à 10^{10} cellules. Plus préférentiellement, ils en comprennent 10^6 à 10^8 .

Plus particulièrement, dans les implants de l'invention, la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant et éventuellement un support permettant l'ancrage des cellules.

25 Pour la préparation des implants selon l'invention, différents types de gélifiants peuvent être employés. Les gélifiants sont utilisés pour l'inclusion des cellules dans une matrice ayant la constitution d'un gel, et pour favoriser l'ancrage des cellules sur le support, le cas échéant. Différents agents d'adhésion cellulaire peuvent donc être utilisés comme gélifiants, tels que notamment le collagène, la gélatine, les
30 glycosaminoglycans, la fibronectine, les lectines, l'agarose etc.

Comme indiqué ci-avant, les compositions selon l'invention comprennent avantageusement un support permettant l'ancrage des cellules. Le terme ancrage désigne toute forme d'interaction biologique et/ou chimique et/ou physique entraînant l'adhésion et/ou la fixation des cellules sur le support. Par ailleurs, les cellules peuvent

soit recouvrir le support utilisé, soit pénétrer à l'intérieur de ce support, soit les deux. On préfère utiliser dans le cadre de l'invention un support solide, non toxique et/ou bio-compatible. En particulier, on peut utiliser des fibres de polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou un support d'origine biologique.

- 5 Les implants selon l'invention peuvent être implantés en différents sites de l'organisme. En particulier, l'implantation peut être effectuée au niveau de la cavité péritonéale, dans le tissu sous-cutané (région sus-pubienne, fosses iliaques ou inguinales, etc), dans un organe, un muscle, une tumeur, le système nerveux central, ou encore sous une muqueuse. Les implants selon l'invention sont particulièrement
10 avantageux en ce sens qu'ils permettent de contrôler la libération du produit thérapeutique dans l'organisme : Celle-ci est tout d'abord déterminée par la multiplicité d'infection et par le nombre de cellules implantées. Ensuite, la libération peut être contrôlée soit par le retrait de l'implant, ce qui arrête définitivement le traitement, soit par l'utilisation de systèmes d'expression régulable, permettant d'induire ou de réprimer
15 l'expression des gènes thérapeutiques.

- La présente invention fournit ainsi des vecteurs viraux utilisables directement en thérapie génique, particulièrement adaptés et efficaces pour diriger l'expression de la superoxyde dismutase in vivo. La présente invention offre ainsi une nouvelle
20 approche particulièrement avantageuse pour le traitement et/ou la prévention de nombreuses pathologies comme celles citées précédemment.

- Les vecteurs adénoviraux selon l'invention présentent en outre des avantages importants, liés notamment à leur très haute efficacité d'infection des cellules cibles, permettant de réaliser des infections à partir de faibles volumes de suspension virale. De plus, l'infection par les adénovirus de l'invention est très localisée au site d'injection,
25 ce qui évite les risques de diffusion aux structures cérébrales voisines. Ce traitement peut concerner aussi bien l'homme que tout animal tel que les ovins, les bovins, les murins, les animaux domestiques (chiens, chats, etc), les chevaux, les poissons, etc.

Les exemples et la figure sont présentés ci-après à titre illustratif et non limitatif du domaine de l'invention.

- 30 Figure 1 : Activité enzymatique de la CuZnSOD humaine (hSOD-1) sur cellules NS20Y infectées par un adénovirus recombinant codant pour la hSOD-1 (0 à 500 pfu/cellule).

Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la
5 purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory,
10 Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille
15 par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications
20 du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut
25 être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être
30 effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Exemples

Exemple 1 : Protocole de construction des vecteurs pLTRIX-hSOD1, pLTRIX-hSOD1 Gly37, et pLTRIX-hSOD1Asn139

Ces vecteurs contiennent les séquences codant pour la SOD1 humaine type sauvage ou mutée sous contrôle du LTR du virus RSV, ainsi que des séquences de l'adénovirus permettant la recombinaison *in vivo*.

Les ADNc codant pour les différents types de SOD mis en oeuvre sont décrits dans Rosen et al., Nature, vol. 362, 52-62, et Deng et al., Science, vol. 261, 1047-1051.

Chaque ADNc est inséré dans un plasmide Bluescript (Stratagène) entre les sites PstI et HindIII. Une séquence de polyadénylation provenant de SV40 a auparavant été introduite dans le site XhoI du même plasmide. Ces plasmides ont pour nom SK-hSOD-PolyA, SK-hSODgly-PolyA et SK-hSODasn-PolyA.

Les vecteurs pLTRIX-hSOD1, pLTRIX-hSOD1gly et pLTRIX-hSOD1 sont obtenus en introduisant dans le site EcoRV du plasmide pLTRIX un insert obtenu par coupure de SK-hSOD-PolyA, SK-hSODgly-PolyA et SK-hSODasn-PolyA par KpnI et SacI (extrémités KpnI et SacI rendues franches).

Exemple 2 : Construction d'adénovirus recombinants contenant une séquence codant pour la CuZn superoxyde dismutase intracellulaire humaine.

Le vecteur pLTR IX-hSOD1 est linéarisé et cotransfecté avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en trans les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

Plus précisément, l'adénovirus Ad-hSOD1 a été obtenu par recombinaison homologue *in vivo* entre l'adénovirus mutant Ad-dl1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le vecteur pLTR IX-hSOD1, selon le protocole suivant : le plasmide pLTR IX-hSOD1 et l'adénovirus Ad-dl1324, linéarisé par l'enzyme ClaI, ont été cotransfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés ont été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant a été amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient.

Exemple 3 : Contrôle de l'expression in vitro de la hSOD-1.

Pour ce faire, on utilise le protocole décrit par Beauchamp et Fridovitch, 1971, Ann-Biochem, Vol.44, pp.276-278.

- 5 Dans chaque cas, un extrait NP-40 est réalisé à partir de 500.000 cellules NS20Y (neuroblastomes de souris), chargé sur gel d'acrylamide non dénaturant, et une électrophorèse est réalisée pendant 3 heures à 100 V.

- 10 La superoxyde dismutase est localisée en trempant le gel dans une solution de nitrobleu de tétrazolium (NBT) et de riboflavine puis dans une solution de tétraméthyléthylènediamine (TEMED). Le gel est ensuite illuminé, et devient ainsi uniformément bleu excepté aux positions contenant la superoxyde dismutase, (la riboflavine réduite en présence de TEMED génère des radicaux superoxyde après reoxydation à l'air. Les radicaux superoxyde produits vont réduire le NBT incolore en un composé bleu (formazan). La SOD, en neutralisant les radicaux superoxyde
- 15 produits, inhibera la réaction colorée, et apparaîtra comme un spot incolore).

REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant défectif comprenant au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou une partie active d'une superoxyde dismutase ou l'un de ses dérivés.
5
2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNc.
3. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNg.
4. Adénovirus selon la revendication 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour une superoxyde dismutase humaine.
10
5. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour la CuZn superoxyde dismutase humaine intracellulaire, SOD1 ou l'un de ses dérivés.
6. Adénovirus selon l'une des revendication 1 à 3 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour un mutant dominant négatif d'une superoxyde dismutase humaine.
15
7. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence antisens dont l'expression permet de contrôler l'expression du gène codant pour la superoxyde dismutase.
20
8. Adénovirus selon la revendication 7 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un gène codant pour un ARN antisens capable de contrôler la traduction de l'ARNm de la superoxyde dismutase.
9. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules cibles.
25
10. Adénovirus selon la revendication 9 caractérisé en ce que les signaux d'expression sont choisis parmi les promoteurs viraux, de préférence parmi les promoteurs E1A, MLP, CMV et LTR-RSV.

11. Adénovirus selon la revendication 10 comprenant une séquence d'ADNg codant pour la CuZn superoxyde dismutase intracellulaire humaine sous le contrôle d'un promoteur LTR-RSV.
12. Adénovirus selon la revendication 10 comprenant une séquence d'ADNc
5 codant pour la CuZn superoxyde dismutase intracellulaire humaine sous le contrôle d'un promoteur LTR-RSV.
13. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 12 caractérisé en ce qu'il est dépourvu des régions de son génome qui sont nécessaires à sa réplication dans la cellule cible.
- 10 14. Adénovirus selon la revendication 13 caractérisé en ce qu'il comprend les ITR et une séquence permettant l'encapsidation, et dans lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 sont non fonctionnels.
- 15 15. Adénovirus selon la revendication 13 ou 14 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus humain de type Ad 2 ou Ad 5 ou canin de type CAV-2.
- 16 16. Utilisation d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 15 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies neurodégénératives.
- 17 17. Utilisation selon la revendication 16 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention de la maladie
20 de Parkinson, d'Alzheimer, de Huntington, de l'ALS, de la trisomie 21.
18. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 15.
19. Composition pharmaceutique selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle contient en outre un adénovirus comportant un gène codant pour la catalase.
- 25 20. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 18 à 19 caractérisée en ce qu'elle est sous forme injectable.
21. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 18 à 20 caractérisée en ce qu'elle comprend entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml adénovirus recombinants défectifs.

22. Cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 15.

23. Cellule selon la revendication 22 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine.

5 24. Cellule selon la revendication 23 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine de type rétinienne, fibroblaste, myoblaste, hépatocyte, cellule endothéliale, cellule Gliales ou kératynocyte.

25. Implant comprenant des cellules infectées selon les revendications 22 à 24 et une matrice extracellulaire.

10 26. Implant selon la revendication 25 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant choisi de préférence parmi le collagène, la gélatine, les glucosaminoglycans, la fibronectine et les lectines.

15 27. Implant selon les revendications 25 ou 26 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend également un support permettant l'ancrage des cellules infectées.

28. Implant selon la revendication 27 caractérisé en ce que le support est constitué préférentiellement par des fibres de polytétrafluoroéthylène.

Best Available Copy

WO 96/00790

PCT/FR95/00854

SOD Souris
Hétérodimère
SOD Humaine 1/1

NS20Y infectés par AdSOD-1 (pfu/cellule)

0 50 100 200 300 500

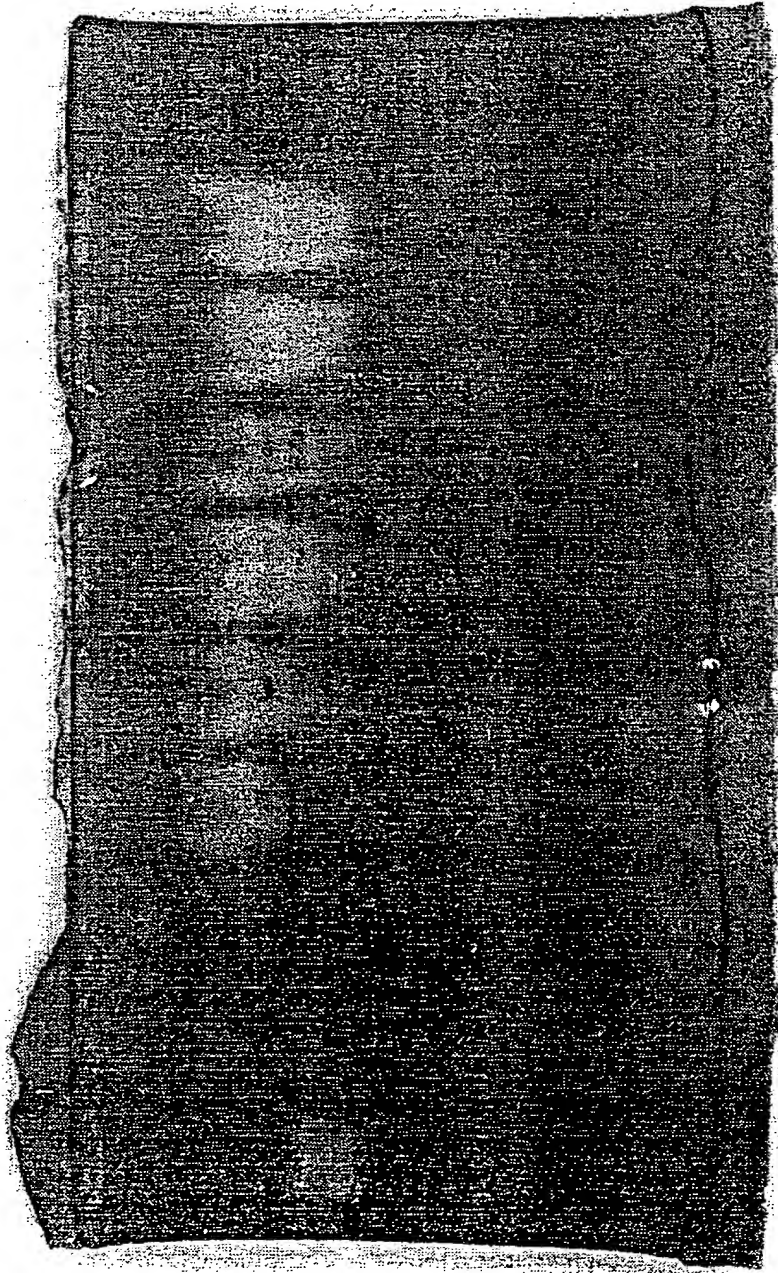


PLANCHE 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.

PCT/FR 95/00854

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 6	C12N15/86	A61K48/00 C12N9/02 A61K38/43
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 6 C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 21, ARLINGTON, VIRGINIA US, page 1607 ERZURUM SC ET AL 'PROTECTION OF HUMAN ENDOTHELIAL-CELLS FROM OXIDANT INJURY BY ADENOVIRUS-MEDIATED TRANSFER OF THE HUMAN CATALASE CDNA' see the whole document ---	1-29
Y	BRAIN PATHOLOGY, vol. 4, page 3 AGUZZI A ET AL 'TRANSGENIC AND KNOCK-OUT MICE - MODELS OF NEUROLOGICAL DISEASE' see page 1, line 1 - page 7, left column, paragraph 2 --- -/--	1-29
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. '&' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
4 October 1995		17. 10. 95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Authorized officer Gurdjian, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Patent Application No

PCT/FR 95/00854

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 213 628 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CPY LTD.) 11 March 1987 see the whole document ---	1-29
Y	SCIENCE., vol. 261, LANCASTER, PA US, page 1047 H.X. DENG ET AL. 'AMYOTROPHIC LATERAL...' cited in the application see the whole document ---	6,17,18
Y	MEDECINE/SCIENCE, vol. 9, page 208 O.DANOS ET AL. 'REEIMPLANTATION ...' see the whole document ---	23-29
A	EP,A,0 340 805 (CHIRON CORP.) 8 November 1989 see claims 1-14 ---	5
A	WO,A,90 06757 (UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 28 June 1990 see the whole document -----	1,17,18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/00854

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0213628	11-03-87	AU-B- 598746	05-07-90
		AU-B- 6219186	05-03-87
		JP-A- 62115277	26-05-87

EP-A-0340805	08-11-89	DE-A- 3485284	02-01-92
		EP-A, B 0138111	24-04-85
		EP-A- 0656418	07-06-95
		IE-B- 59518	09-03-94
		IE-B- 59492	09-03-94
		JP-A- 6165674	14-06-94
		JP-A- 60137286	20-07-85
		JP-A- 5192140	03-08-93
		WO-A- 8501503	11-04-85
		US-A- 5066591	19-11-91
		US-A- 5252476	12-10-93

WO-A-9006757	28-06-90	US-A- 5082670	21-01-92
		CA-A- 2005567	15-06-90
		EP-A- 0449948	09-10-91
		JP-T- 4503351	18-06-92

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 95/00854

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/86 A61K48/00 C12N9/02 A61K38/43		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 21, ARLINGTON, VIRGINIA US, page 1607 ERZURUM SC ET AL 'PROTECTION OF HUMAN ENDOTHELIAL-CELLS FROM OXIDANT INJURY BY ADENOVIRUS-MEDIATED TRANSFER OF THE HUMAN CATALASE CDNA' voir le document en entier ---	1-29
Y	BRAIN PATHOLOGY, vol. 4, page 3 AGUZZI A ET AL 'TRANSGENIC AND KNOCK-OUT MICE - MODELS OF NEUROLOGICAL DISEASE' voir page 1, ligne 1 - page 7, colonne de gauche, alinéa 2 --- <div style="text-align: right;">-/--</div>	1-29
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>* 'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>* 'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>* 'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>* 'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>* 'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>* 'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>* 'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>* 'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>* 'Z' document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">4 Octobre 1995</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">17. 10. 95</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Gurdjian, D</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 95/00854

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP,A,0 213 628 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CPY LTD.) 11 Mars 1987 voir le document en entier ---	1-29
Y	SCIENCE., vol. 261, LANCASTER, PA US, page 1047 H.X. DENG ET AL. 'AMYOTROPHIC LATERAL...' cité dans la demande voir le document en entier ---	6,17,18
Y	MEDECINE/SCIENCE, vol. 9, page 208 O.DANOS ET AL. 'REEIMPLANTATION ...' voir le document en entier ---	23-29
A	EP,A,0 340 805 (CHIRON CORP.) 8 Novembre 1989 voir revendications 1-14 ---	5
A	WO,A,90 06757 (UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 28 Juin 1990 voir le document en entier -----	1,17,18

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. Internationale No

PCT/FR 95/00854

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0213628	11-03-87	AU-B- 598746	05-07-90
		AU-B- 6219186	05-03-87
		JP-A- 62115277	26-05-87

EP-A-0340805	08-11-89	DE-A- 3485284	02-01-92
		EP-A,B 0138111	24-04-85
		EP-A- 0656418	07-06-95
		IE-B- 59518	09-03-94
		IE-B- 59492	09-03-94
		JP-A- 6165674	14-06-94
		JP-A- 60137286	20-07-85
		JP-A- 5192140	03-08-93
		WO-A- 8501503	11-04-85
		US-A- 5066591	19-11-91
		US-A- 5252476	12-10-93

WO-A-9006757	28-06-90	US-A- 5082670	21-01-92
		CA-A- 2005567	15-06-90
		EP-A- 0449948	09-10-91
		JP-T- 4503351	18-06-92
